



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102621326 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201210042064. 9

(22) 申请日 2012. 02. 23

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路  
199 号

(72) 发明人 邓安平 宋娟 杨红

(74) 专利代理机构 北京瑞思知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11341

代理人 李涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101407501 A, 2009. 04. 15, 全文.

WO 2007/024735 A3, 2007. 03. 01, 全文.

颜露. 呋喃它酮代谢物 AMOZ 单克隆抗体的制备及免疫学检测方法的研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》. 2011, (第 10 期), 第 11-13、18-26、32-39 页.

审查员 张绚

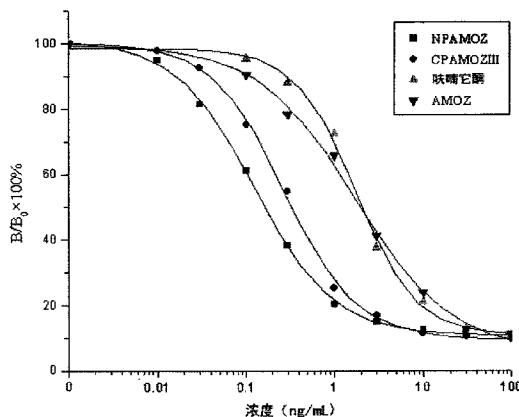
权利要求书3页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测食品中呋喃它酮代谢物含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了直接检测食品中呋喃它酮代谢物 AMOZ 含量的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA)。其特点是合成了三种不同的 AMOZ 半抗原衍生物, 并将衍生物与载体蛋白质交联, 合成三种免疫原和包被抗原, 运用杂交瘤单抗制备技术制得单克隆抗体。所建立的 ELISA 可以无需衍生化步骤而直接检测样品中的 AMOZ; 所制备的单抗与其它硝基呋喃类物质及其代谢物和 8 种抗生素均没有交叉反应, 说明抗体的特异性很高。四种肉样即鱼肉、虾肉、鸡肉和猪肝中加入不同量的 AMOZ, 并用 ELISA 直接测定, 加标回收率为 72. 6-102. 7%, 相对标准偏差为 6. 1-17. 7%; 七份加标样品同时用 HPLC 和 ELISA 检测并比较测定结果, 回归曲线为  $Y = 0. 9742X - 7. 6001$ , 线性相关系数为 0. 9889, 表明两种方法有较好的相关性。



1. 一种检测食品中呋喃它酮代谢物含量的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

- 步骤一:AMOZ 修饰物的制备;
  - 步骤二:免疫原和包被抗原的制备;
  - 步骤三:AMOZ 单克隆抗体的制备;
  - 步骤四:建立测定 AMOZ 的酶联免疫吸附分析方法;
  - 步骤五:ELISA 对加标样品中 AMOZ 含量的测定;
- 其中,所述步骤二包括:

分别称取 CPAMOZ I 或 CPAMOZ II,或 CPAMOZ III 和二环己基碳二亚胺,N-羟基琥珀酰亚胺,一同溶解于二甲基甲酰胺中,室温下搅拌过夜,将混合液离心 5 ~ 20 分钟,取上层清液,缓慢加入到 0.01 ~ 0.02% 的牛血清白蛋白即 BSA 和 0.01 ~ 0.02% 卵清白蛋白即 OVA,搅拌 1 ~ 10 小时,离心分离,取上层清液,透析数天,溶液冷冻干燥,置冰箱中存放,其中,CPAMOZ I-BSA、CPAMOZ II-BSA 和 CPAMOZ III-BSA 为免疫原;CPAMOZ I-OVA、CPAMOZ II-OVA 和 CPAMOZ III-OVA 为包被抗原;

其中,所述步骤四包括:

- (1) 溶液配制;
- (2) 间接竞争 ELISA 步骤;
- (3) ELISA 的优化条件和灵敏度;
- (4) ELISA 的标准曲线;
- (5) ELISA 的特异性;

其中,所述 (1) 溶液配制包括:

- (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;
- (b). 磷酸缓冲液;
- (c). 酪蛋白溶液;
- (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液;
- (e). 底物溶液;
- (f).  $H_2SO_4$  溶液;
- (g) RPMI-1640 培养液;

其中,所述 (2) 间接竞争 ELISA 步骤包括:

- (a). 加入包被抗原于酶标板中,每孔 200  $\mu$  L,冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜;
- (b). 用 PBST 缓冲液, PBST 储备液, 1 : 10 稀释, 350  $\mu$  L/ 孔,洗板三次;
- (c). 加入酪蛋白进行封阻,每孔 300  $\mu$  L,室温保温保湿放置 1 小时;
- (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100  $\mu$  L 标准溶液和 100  $\mu$  L 一定稀释度的单克隆抗体,室温保温保湿放置 1 小时;
- (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- (g). 加入酶标二抗:羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (GaMIgG-HRP),每孔 200  $\mu$  L,室温保温保湿放置 1 小时;
- (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次;

(i). 加入底物溶液, 每孔 200  $\mu$  L, 室温保温保湿避光反应, 在微量振荡器上振摇 15 ~ 25 分钟;

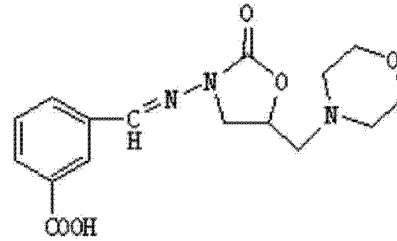
(j). 加入 5%  $H_2SO_4$  溶液, 每孔 50 ~ 100  $\mu$  L, 终止酶反应;

(k). 用酶标仪测定吸光度, 作出标准曲线, 进行结果分析与讨论;

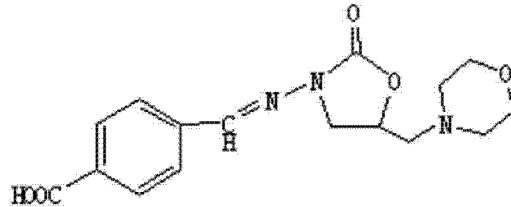
其中, 所述 (3) ELISA 的优化条件和灵敏度包括:

包被浓度为 25ng/mL; 细胞上清液稀释度为 1 : 1500; GaMIgG-HRP 为 1 : 10,000; 封阻液为 1% casein; 孵育时间为 1h; 显色时间为 15min;

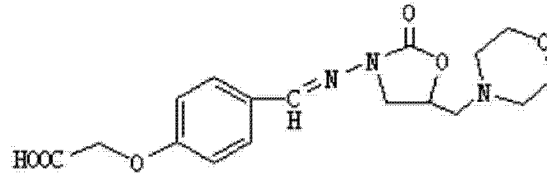
其中, CPAMOZ I 的结构式为:



CPAMOZ II 的结构式为:

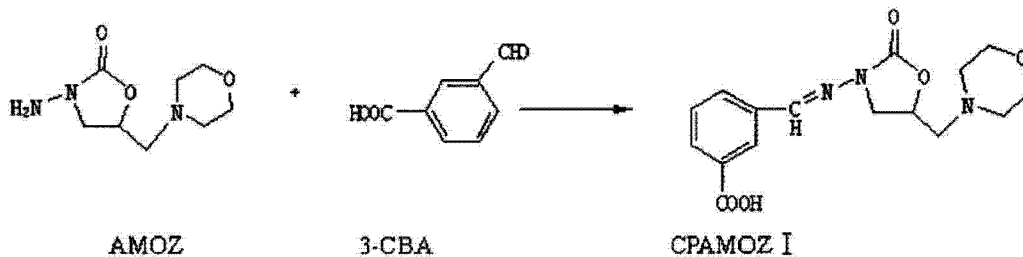


CPAMOZ III 的结构式为:



2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述步骤一包括:

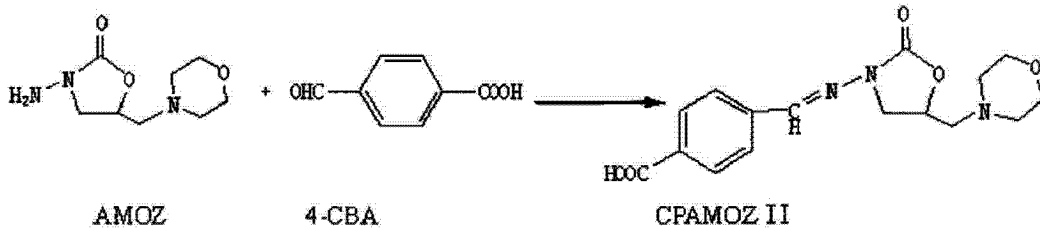
1) CPAMOZ I 的合成称取 3-羧基苯甲醛加入反应瓶, 用无水甲醇溶解, 再加入 AMOZ, 溶解完全后, 65 $^{\circ}$ C 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时, 取出, 将反应液离心, 弃去上层清液, 沉淀用冰无水乙醇洗涤后, 得白色沉淀, 真空抽干, 4 $^{\circ}$ C 下保存, 产物简称为 CPAMOZ I, 其反应式如下:



2) CPAMOZII 的合成

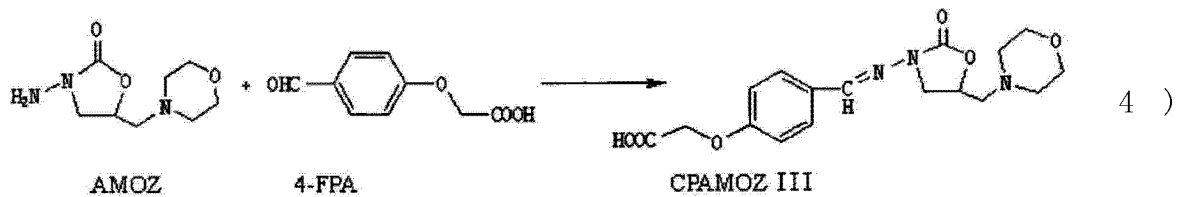
称取 4-羧基苯甲醛加入反应瓶, 用无水甲醇溶解, 再加入 AMOZ, 溶解完全后, 65 $^{\circ}$ C 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时, 取出, 将反应液离心, 弃去上层清液, 沉淀用冰无水乙醇洗涤后, 得

白色沉淀,真空抽干,4℃下保存,产物简称为 CPAMOZ II,其反应式如下:



### 3) CPAMOZIII 的合成

称取 4- 甲酰苯氧基乙酸加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入 AMOZ,溶解完全后,65℃ 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时,取出,将反应液离心,弃去上层清液,沉淀用冰无水乙醇洗涤后,得白色沉淀,真空抽干,4℃下保存,产物简称为 CPAMOZIII,其反应式如下:



CPAMOZ I、CPAMOZ II 和 CPAMOZ III 的表征:

<sup>1</sup>H-NMR 谱:用 Bruker AMX-300 核磁共振仪测试 CPAMOZ I、CPAMOZ II 和 CPAMOZIII 的核磁谱,以氘代二甲亚砜溶液为溶剂,内标为 TMS;

CPAMOZ I<sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):13.164(s,1H,-COOH),7.953(t,4H,C<sub>6</sub>H),8.332(S,1H,CH=N);4.930(S,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>);

CPAMOZ II<sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):13.039(s,1H,-COOH),7.828(d,4H,C<sub>6</sub>H),7.916(S,1H,CH=N),4.931(S,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>);

CPAMOZ III<sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):12.934(s,1H,-COOH),6.999-7.666(t,4H,C<sub>6</sub>H),7.796(S,1H,CH=N),4.914(S,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>),4.735(S,2H,-O-CH<sub>2</sub>-COOH)。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述(4)ELISA 的标准曲线包括:

分别选用 NPAMOZ,CPAMOZ,AMOZ 和 FTD 作为目标物,考察了 ELISA 的灵敏度;分别以目标物浓度的对数为横坐标,以相对信号 B/B<sub>0</sub>×100%为纵坐标作出标准曲线;

B<sub>0</sub>:标准浓度为 0ng/mL 所对应的吸光度;B:其它标准浓度所对应的吸光度。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述(5)ELISA 的特异性包括:ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示;交叉反应率 CR% = NPAMOZ 的 IC<sub>50</sub>/测试物质的 IC<sub>50</sub>×100%;交叉反应率越小,ELISA 的特异性越高。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述步骤五包括:

选择四种样品:鱼肉、虾肉、鸡肉和猪肝进行加标反应实验;同一样品取两份,一份加入适量的 AMOZ 溶液,一份作为空白样品;在样品中分别加入 H<sub>2</sub>O 和盐酸溶液,旋涡,37℃ 振荡孵育 16h 后,分别加入 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaOH 和乙酸乙酯,剧烈振荡 30s,室温下 5000r/10min 离心,再用乙酸乙酯提取,合并乙酸乙酯层,氮气吹至干,用正己烷溶解干燥物,加入 pH = 7.2 磷酸缓冲液,室温下 3000r/10min 离心,上清用水稀释后用 ELISA 直接测定。

## 一种检测食品中呋喃它酮代谢物含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种直接检测食品中呋喃它酮代谢物 5- 吗啉甲基 -3- 氨基 -2- 恶唑烷酮 (AMOZ) 含量的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA), 属于食品安全监督或食品分析的研究领域。

### 背景技术

[0002] 呋喃它酮 (FTD) 属于硝基呋喃类药物, 是一种广谱抗生素, 曾被广泛应用于家畜、家禽中痢疾、肠炎、球虫病的预防和治疗。但研究表明, 该药物具有严重的致癌等毒副作用, 因此近十多年来世界各国陆续禁用该药物并限定了残留标准。然而国内外仍不时有呋喃它酮检测超标的报道。呋喃它酮抗生素对光敏感, 具有代谢快速的特点, 在动物体内的半衰期不过数小时, 通常不太可能检出原药残留, 而其代谢物 5- 吗啉甲基 -3- 氨基 -2- 恶唑烷酮 (AMOZ) 在体内较稳定, 因此可通过检测 AMOZ 的含量判断是否存在违规使用呋喃它酮。

[0003] 1990 年欧盟颁布条例, 规定硝基呋喃类药物及其代谢产物在动物源性食品中的残留检测限为  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 而 AMOZ 的检测限为  $300\text{ng}/\text{kg}$ 。澳大利亚 (1993), 菲律宾 (2001), 巴西 (2002), 泰国 (2002) 和美国 (2002) 也相继颁布条例禁止其使用。我国农业部文件农牧发 [2002]1 号文件也规定动物源性食品中硝基呋喃类药物及其代谢物为不得检出。

[0004] AMOZ 的检测方法主要是色谱分析法。由于原药化合物半衰期通常只有几小时, 而其代谢产物则可与动物组织中的蛋白结合而形成稳定的化合物, 稳定期可长达几个星期, 因此, 目前国内外报道多见于检测其代谢物。由于硝基呋喃代谢产物分子量比较小, 为了增加分子量和产生强紫外吸收, 使结果更加精确, 现有的分析方法多为先让硝基呋喃代谢产物在酸性条件下水解, 同时用 2- 硝基苯甲醛等衍生化试剂进行衍生化, 所生成的代谢物的衍生物经提取和进一步净化, 再用高效液相色谱 (HPLC)、液相色谱 - 质谱 (LC-MS)、液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 等仪器进行检测。我国质检总局发布的国家标准 (GB/T21311-2007), 将样品在酸性条件下水解, 同时用 2- 硝基苯甲醛进行衍生化, 调  $\text{pH} = 7.4$  后, 用乙酸乙酯提取生成的衍生物 (NPAMOZ), 正己烷净化, 再用液相色谱 - 串联质谱进行定性检测, 采用稳定同位素内标法进行定量测定。尽管色谱分析方法较准确, 但色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高, 而且不能直接测定食品中 AMOZ 含量。

[0005] 酶联免疫吸附分析方法 (ELISA) 具有灵敏度高、特异性强、分析快速的优点, 已广泛用于临床、药物、食品和环境等分析领域。国内已有申请以多克隆抗体为基础的 ELISA 测定食品中 AMOZ 含量的专利, 申请号为 200810219298. X。但是其仍然不能直接测定 AMOZ, 而需要用 2- 硝基苯甲醛进行衍生化后, 再测定 AMOZ 与 2- 硝基苯甲醛形成的衍生物 NPAMOZ。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种直接检测食品中 AMOZ 含量的酶联免疫吸附分析方法, 其特点是基于抗原与抗体之间特异性反应而建立的分析方法。

[0007] 本发明的目的由以下技术措施实现, 其中所述原料份数除特殊说明外均为重量份

数。直接检测食品中 AMOZ 含量的酶联免疫吸附分析方法：

[0008] 一种检测食品中呋喃它酮代谢物含量的方法，包括以下步骤：

[0009] 步骤一：AMOZ 修饰物的制备；

[0010] 步骤二：免疫原和包被抗原的制备；

[0011] 步骤三：AMOZ 单克隆抗体的制备；

[0012] 步骤四：建立测定 AMOZ 的酶联免疫吸附分析方法；

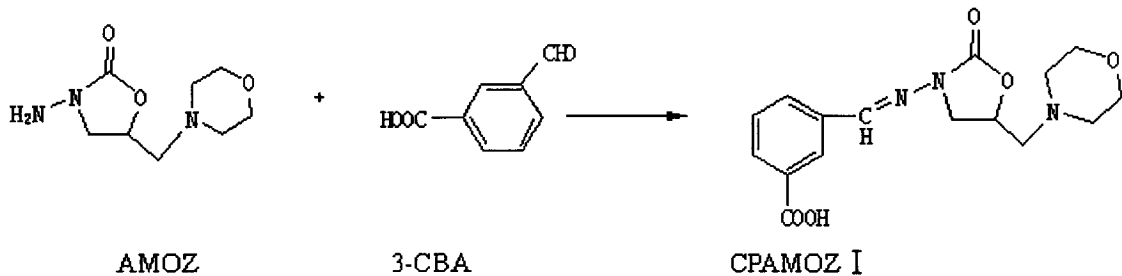
[0013] 步骤五：ELISA 对加标样品中 AMOZ 含量的测定。

[0014] 其中，所述步骤一包括：

[0015] 1) CPAMOZ I 的合成

[0016] 称取 3- 羧基苯甲醛加入反应瓶，用无水甲醇溶解，再加入 AMOZ，溶解完全后，65℃ 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时，取出，将反应液离心，弃去上层清液，沉淀用冰无水乙醇洗涤后，得白色沉淀，真空抽干，4℃ 下保存，产物简称为 CPAMOZ I，其反应式如下：

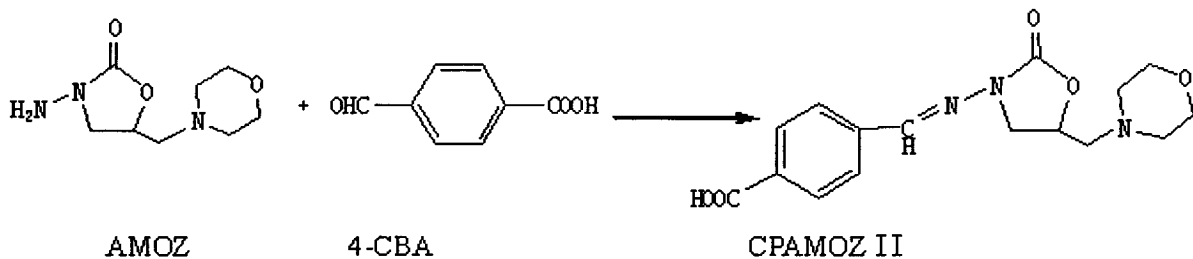
[0017]



[0018] 2) CPAMOZ II 的合成

[0019] 称取 4- 羧基苯甲醛加入反应瓶，用无水甲醇溶解，再加入 AMOZ，溶解完全后，65℃ 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时，取出，将反应液离心，弃去上层清液，沉淀用冰无水乙醇洗涤后，得白色沉淀，真空抽干，4℃ 下保存，产物简称为 CPAMOZ II，其反应式如下：

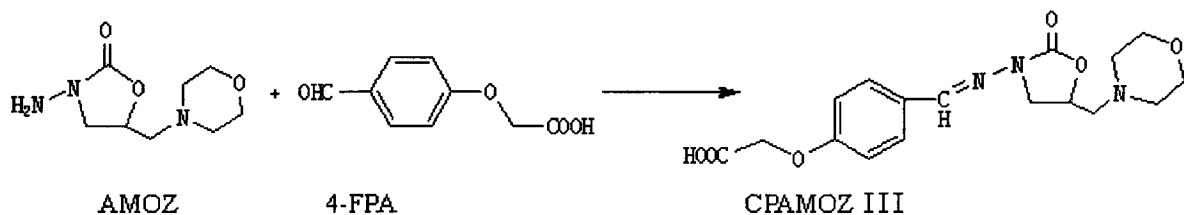
[0020]



[0021] 3) CPAMOZ III 的合成

[0022] 称取 4- 甲酰苯氧基乙酸加入反应瓶，用无水甲醇溶解，再加入 AMOZ，溶解完全后，65℃ 氮气保护下反应 5 ~ 12 小时，取出，将反应液离心，弃去上层清液，沉淀用冰无水乙醇洗涤后，得白色沉淀，真空抽干，4℃ 下保存，产物简称为 CPAMOZ III，其反应式如下：

[0023]



[0024] 4) CPAM0Z I、CPAM0Z II 和 CPAM0Z III 的表征：

[0025]  $^1\text{H-NMR}$  谱：用 Bruker AMX-300 核磁共振仪测试 CPAM0Z I、CPAM0Z II 和 CPAM0Z III 的核磁谱，以氘代二甲亚砜溶液为溶剂，内标为 TMS；

[0026] CPAM0Z I  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO,  $\delta$  vs TMS) :13.164 (s, 1H, -COOH), 7.953 (t, 4H,  $\text{C}_6\text{H}$ ), 8.332 (s, 1H, CH = N) ;4.930 (s, 2H, -O-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ )。；

[0027] CPAM0Z II  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO,  $\delta$  vs TMS) :13.039 (s, 1H, -COOH), 7.828 (d, 4H,  $\text{C}_6\text{H}$ ), 7.916 (s, 1H, CH = N), 4.931 (s, 2H, -O-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ )。；

[0028] CPAM0Z III  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO,  $\delta$  vs TMS) :12.934 (s, 1H, -COOH), 6.999-7.666 (t, 4H,  $\text{C}_6\text{H}$ ), 7.796 (s, 1H, CH = N), 4.914 (s, 2H, -O-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ ), 4.735 (s, 2H, -O- $\text{CH}_2$ -COOH)。

[0029] 其中,所述步骤二包括：

[0030] 分别称取 CPAM0Z I 或 CPAM0Z II, 或 CPAM0Z III 和二环己基碳二亚胺, N-羟基琥珀酰亚胺, 一同溶解于二甲基甲酰胺中, 室温下搅拌过夜, 将混合液离心 5 ~ 20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入到 0.01 ~ 0.02% 的牛血清白蛋白即 BSA 和 0.01 ~ 0.02% 卵清白蛋白即 OVA, 搅拌 1 ~ 10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 溶液冷冻干燥, 置冰箱中存放, 其中, CPAM0Z I-BSA、CPAM0Z II-BSA 和 CPAM0Z III-BSA 为免疫原; CPAM0Z I-OVA、CPAM0Z II-OVA 和 CPAM0Z III-OVA 为包被抗原。

[0031] 其中,所述步骤四包括：

[0032] (1) 溶液配制；

[0033] (2) 间接竞争 ELISA 步骤；

[0034] (3) ELISA 的优化条件和灵敏度；

[0035] (4) ELISA 的标准曲线；

[0036] (5) ELISA 的特异性。

[0037] 其中,所述 (1) 溶液配制包括：

[0038] (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液；

[0039] (b). 磷酸缓冲液；

[0040] (c). 酪蛋白溶液；

[0041] (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液；

[0042] (e). 底物溶液；

[0043] (f).  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液；

[0044] (g) RPMI-1640 培养液。

[0045] 其中,所述 (2) 间接竞争 ELISA 步骤包括：

[0046] (a). 加入包被抗原于酶标板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 冰箱 4 $^\circ\text{C}$  过夜；

[0047] (b). 用 PBST 缓冲液, PBST 储备液, 1 : 10 稀释, 350  $\mu\text{L}$ /孔, 洗板三次；

[0048] (c). 加入酪蛋白进行封阻, 每孔 300  $\mu\text{L}$ , 室温保温保湿放置 1 小时；

[0049] (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次；

[0050] (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100  $\mu\text{L}$  标准溶液和 100  $\mu\text{L}$  一定稀释度的单克隆抗体, 室温保温保湿放置 1 小时；

[0051] (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次；

[0052] (g). 加入酶标二抗 (羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶, GaMIgG-HRP), 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 室

温保温保湿放置 1 小时；

[0053] (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次；

[0054] (i). 加入底物溶液, 每孔 200  $\mu$  L, 室温保温保湿避光反应, 在微量振荡器上振摇约 15 ~ 25 分钟；

[0055] (j). 加入 5%  $H_2SO_4$  溶液, 每孔 50 ~ 100  $\mu$  L, 终止酶反应；

[0056] (k). 用酶标仪测定吸光度, 作出标准曲线, 进行结果分析与讨论

[0057] 其中, 所述 (3) ELISA 的优化条件和灵敏度包括：

[0058] 包被浓度为 25ng/mL；细胞上清液稀释度为 1 : 1500；GaMIgG-HRP 为 1 : 10,000；封阻液为 1% casein；孵育时间为 1h；显色时间为 15min。

[0059] 其中, 所述 (4) ELISA 的标准曲线包括：

[0060] 分别选用 NPAMOZ, CPAMOZ, AMOZ 和 FTD 作为目标物, 考察了 ELISA 的灵敏度；

[0061] 分别以目标物浓度的对数为横坐标, 以相对信号  $B/B_0 \times 100\%$  为纵坐标作出标准曲线；

[0062]  $B_0$ : 标准浓度为 0ng/mL 所对应的吸光度； $B$ : 其它标准浓度所对应的吸光度。

[0063] 其中, 所述 (5) ELISA 的特异性包括：

[0064] ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示；交叉反应率  $CR\% = NPAMOZ$  的  $IC_{50}/$  测试物质的  $IC_{50} \times 100\%$ ；交叉反应率越小, ELISA 的特异性越高。

[0065] 其中, 所述步骤五包括：

[0066] 选择四种样品：鱼肉、虾肉、鸡肉和猪肝进行加标反应实验；同一样品取两份, 一份加入适量的 AMOZ 溶液, 一份作为空白样品；在样品中分别加入  $H_2O$  和盐酸溶液, 旋涡, 37  $^{\circ}C$  振荡孵育 16h 后, 分别加入  $K_2HPO_4$ 、NaOH 和乙酸乙酯, 剧烈振荡 30s, 室温下 5000r/10min 离心, 再用乙酸乙酯提取, 合并乙酸乙酯层, 氮气吹至干, 用正己烷溶解干燥物, 加入 pH = 7.2 磷酸缓冲液, 室温下 3000r/10min 离心, 上清用水稀释后用 ELISA 直接测定。

[0067] 本发明的优点：

[0068] 1. 成功制备出抗 AMOZ 的单克隆抗体, 并建立起直接测定样品中 AMOZ 含量的 ELISA 方法, 而无需样品的衍生化, 这在国内、外均属于首次。

[0069] 2. 灵敏度高、特异性强。

[0070] 3. 样品处理简单、测试量大、测试费用低。

[0071] 4. 对样品的测定, ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

#### 附图说明

[0072] 图 1. 免疫原的紫外 - 可见光谱图。

[0073] 图 2. 基于单克隆抗体建立的 ELISA 标准曲线。

[0074] 图 3. 为 ELISA 和 HPLC 对 6 个加标样品中 AMOZ 的检测结果的相关曲线。

#### 具体实施方式

[0075] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述, 有必要在此指出的是本实施只用于对发明进行进一步说明, 但不能理解为对本发明保护范围的限制, 该领域的技术熟练人员可

以根据上述本发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

[0076] 实施例：

[0077] 1. AMOZ 修饰物的制备

[0078] AMOZ 是小分子化合物,没有免疫原性,不能直接免疫动物产生抗体,必须对 AMOZ 的分子结构进行合理、有效的化学修饰,使其带有活性基团,才能与载体蛋白交联,制得免疫原和包被抗原。本发明制备了三种 AMOZ 修饰物：

[0079] (1)CPAMOZ I 的合成

[0080] 称取 3- 羧基苯甲醛 (3-CBA) 0.055 ~ 0.075mmol 加入反应瓶,用尽量少的无水甲醇溶解,再加入 AMOZ 0.05 ~ 0.08mmol,溶解完全后,65℃氮气保护下反应 5 ~ 12 小时,取出,将反应液离心,弃去上层清液,沉淀用冰无水乙醇洗涤三次后,得白色沉淀,真空抽干,产率 73%,4℃下保存,产物简写为 CPAMOZ I。

[0081] (2)CPAMOZ II 的合成

[0082] 称取 4- 羧基苯甲醛 (4-CBA) 0.055 ~ 0.075mmol 加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入 AMOZ 0.05 ~ 0.08mmol,溶解完全后,65℃氮气保护下反应 5 ~ 12 小时,取出,将反应液离心,弃去上层清液,沉淀用冰无水乙醇洗涤三次后,得白色沉淀,真空抽干,产率 73%,4℃下保存,产物简写为 CPAMOZ II。

[0083] (3)CPAMOZ III 的合成

[0084] 称取 4- 甲酰苯氧基乙酸 (4-FPA) 0.055 ~ 0.075mmol 加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入 AMOZ 0.05 ~ 0.08mmol,溶解完全后,65℃氮气保护下反应 5 ~ 12 小时,取出,将反应液离心,弃去上层清液,沉淀用冰无水乙醇洗涤三次后,得白色沉淀,真空抽干,产率 75%,4℃下保存,产物简写为 CPAMOZ III。

[0085] (4)CPAMOZ I、CPAMOZ II 和 CPAMOZ III 的表征

[0086] <sup>1</sup>H-NMR 谱:用 Bruker AMX-300 核磁共振仪测试 CPAMOZ I、CPAMOZ II 和 CPAMOZ III 的核磁谱,以氘代二甲亚砜溶液为溶剂,内标为 TMS。

[0087] CPAMOZ I <sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):13.164(s,1H,-COOH),7.953(t,4H,C<sub>6</sub>H),8.332(s,1H,CH=N);4.930(s,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)。

[0088] CPAMOZ II <sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):13.039(s,1H,-COOH),7.828(d,4H,C<sub>6</sub>H),7.916(s,1H,CH=N),4.931(s,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)。

[0089] CPAMOZ III <sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ vs TMS):12.934(s,1H,-COOH),6.999-7.666(t,4H,C<sub>6</sub>H),7.796(s,1H,CH=N),4.914(s,2H,-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>),4.735(s,2H,-O-CH<sub>2</sub>-COOH)。

[0090] 2. 免疫原和包被抗原的制备

[0091] 分别称取 0.10 ~ 0.45mmol 的 CPAMOZ I(或 CPAMOZ II,或 CPAMOZ III),二环己基碳二亚胺 0.10 ~ 0.80mmol, N- 羟基琥珀酰亚胺 0.10 ~ 0.80mmol,一同溶解于 100 ~ 600 μL 的二甲基甲酰胺中,室温下搅拌过夜,将混合液离心 5 ~ 20 分钟,取上层清液,缓慢加入到 0.01 ~ 0.02% 的牛血清白蛋白即 BSA 和 0.01 ~ 0.02% 卵清白蛋白即 OVA,搅拌 1 ~ 10 小时,离心分离,取上层清液,透析数天,溶液冷冻干燥,置冰箱中存放,其中,CPAMOZ I-BSA、CPAMOZ II-BSA 和 CPAMOZ III-BSA 为免疫原;CPAMOZ I-OVA、CPAMOZ II-OVA 和 CPAMOZ III-OVA 为包被抗原;

[0092] 图 1 为 BSA、AMOZ 和 CPAMOZ III-BSA 的紫外-可见光谱图,a. BSA;b. CPAMOZ III;

c. CPAMOZ III-BSA。由图 1 可知,在 280nm 出现了蛋白质的特征吸收峰,而在 288nm 附近出现了 CPAMOZ III 的特征吸收峰。与前两者相区别的是 CPAMOZ III-BSA 的吸收峰为 282nm。紫外图谱证明,CPAMOZ III 成功地与载体蛋白结合。其他免疫原与包被抗原的紫外图谱与之类似。

### [0093] 3. AMOZ 单克隆抗体的制备

[0094] 免疫:将免疫原溶于生理盐水中,再与等体积的完全福氏佐剂混合,皮下多点免疫 BALB/C 小鼠,每只小鼠免疫原剂量在 50 ~ 100  $\mu$ g,第一次免疫后,每隔两周再次免疫,将完全福氏佐剂换成不完全福氏佐剂,第三次免疫后一周,尾部取血检测抗血清效价,最后一次腹腔加强免疫,不加佐剂。

[0095] 融合:最后一次对小鼠加强免疫,三天后取小鼠脾脏,将脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5 : 1 ~ 10 : 1 的比例混合,在 50% 聚乙二醇 4000 的作用下融合,杂交瘤细胞用 HAT 培养液混悬,加入预先含有饲养细胞的 96 孔培养板,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

[0096] 筛选:融合后 2 周左右,用间接 ELISA 法筛选,将阴性孔无色或接近无色,而阳性孔明确显色的细胞用有限稀释法进行亚克隆 2-3 次,及时进行检测。

[0097] 单克隆抗体的大量生产:先腹腔注射液体石蜡于 BALB/C 小鼠,7-10 天后腹腔接种杂交瘤细胞,观察小鼠腹水情况,待腹水尽可能多,濒于死亡之前,收集腹水。用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体,纯化抗体与等体积甘油 1 : 1 混合并置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

### [0098] 4. 建立测定 AMOZ 的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA)

[0099] 优化实验条件,对所制得的抗体进行性能表征,在实验条件优化的基础上,建立以单克隆抗体为基础的测定食品中 AMOZ 含量的酶联免疫吸附分析方法。

#### [0100] (1) 溶液配制

##### [0101] (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液

[0102] 称取 2.606g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 3.434g NaHCO<sub>3</sub>, 用 800mL 超纯水混匀溶解后,调节 pH 值,加水至 1L,配成 0.05mol/L, pH = 9.6 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;

##### [0103] (b). 磷酸缓冲液 (储备液, PBSx10)

[0104] 称取 21.961g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 6.031g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 87.666g NaCl, 加 800mL 超纯水混合,加热溶解;用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH = 7.4;加超纯水至 1L,配成含 0.15mol/L NaCl, pH = 7.4 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (储备液);

##### [0105] (c). 酪蛋白溶液

[0106] 称取酪蛋白加热溶解于 0.01mol/L 的 PBS 中,配成 0.5 ~ 2% 酪蛋白溶液;

[0107] (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液 (含 1% Tween20 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液, PBSTx10, pH = 7.4)。

[0108] (e). 底物溶液 (20mL 纯水; 1mL 醋酸钠缓冲液; 200  $\mu$ l 四甲基联苯胺 (TMB) (1%); 20  $\mu$ l 过氧化氢 (5%))

##### [0109] ①. 醋酸钠缓冲液

[0110] 称取 3.450g CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O, 用 100mL 超纯水溶解,再用 1mol/L 柠檬酸 (称取 21.031g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 溶解于 100mL 水中) 调节 pH = 5.8 后,再加水到 250mL 容量瓶中,配成 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液;

- [0111] ②. TMB:称取 0.0717g TMB,用 7.17mL 二甲基亚砷溶解,混匀,配成 1%,v/v;
- [0112] ③. 过氧化氢:取 20  $\mu$ L 30%的过氧化氢加入 100  $\mu$ L 超纯水中,混匀,配成 5%;
- [0113] (f).  $H_2SO_4$  溶液:移取 25mL 浓  $H_2SO_4$ ,溶解于 475mL 的超纯水中,配成 5%  $H_2SO_4$  溶液;
- [0114] (g)RPMI-1640 培养液:RPMI-1640 固体粉末 10.4g 溶于 800ml 超纯水中,加入 HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)4.67g,并按终体积 1L 计算加入 200mmol/L L-谷氨酸、100mmol/L 2-巯基乙醇及 1mmol/L(即 0.1g/L)丙酮酸钠,再加入  $10^{10}$  青霉素以及  $10^{10}$  链霉素,补加超纯水使终体积达 1000ml,磁力搅拌 3~4 小时,充分溶解后再加入  $NaHCO_3$  约 2g 调节培养液 pH 至 7.2~7.4,0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌,无菌分装,-20 $^{\circ}C$  密封保存。
- [0115] (2) 主要仪器
- [0116] 洗板机:A5082, Tecan, Austria;酶标仪:A2082, Tecan, Austria;高效液相色谱仪:Alltech-1001
- [0117] (3) 间接竞争 ELISA 步骤
- [0118] (a). 加入一定浓度的包被抗原于酶标板中,每孔 200  $\mu$ L,冰箱 4 $^{\circ}C$  过夜;
- [0119] (b). 用 PBST 缓冲液(PBST 储备液,1:10 稀释,350  $\mu$ L/孔)洗板三次;
- [0120] (c). 加入酪蛋白进行封阻,每孔 300  $\mu$ L,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0121] (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0122] (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100  $\mu$ L 标准溶液和 100  $\mu$ L 一定稀释度的单克隆抗体,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0123] (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0124] (g). 加入酶标二抗(羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶, GaMIgG-HRP),每孔 200  $\mu$ L,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0125] (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0126] (i). 加入底物溶液(临用新配),每孔 200  $\mu$ L,室温保温保湿避光反应,在微量振荡器上振摇约 15~25 分钟;
- [0127] (j). 加入 5%  $H_2SO_4$  溶液,每孔 50~100  $\mu$ L,终止酶反应;
- [0128] (k). 用酶标仪测定吸光度,作出标准曲线,进行结果分析与讨论。
- [0129] (4)ELISA 的优化条件和灵敏度
- [0130] 包被浓度为 25ng/mL;细胞上清液稀释度为 1:1500;GaMIgG-HRP 为 1:10,000;封阻液为 1% casein;孵育时间为 1h;显色时间为 15min。
- [0131] (5)ELISA 的标准曲线
- [0132] :图 2 是以 NPAMoz, CPAMoz, AMoz 和 FTD 为检测对象的 ELISA 标准曲线, NPAMoz(■), CPAMoz(●), AMoz(▼) and FTD(▲)。表 1 为  $IC_{50}$  和 LOD 值。
- [0133] 表 1:ELISA 检测 NPAMoz, CPAMoz, AMoz 和 FID 的  $IC_{50}$  和 LOD 值
- [0134]

NPAMOZ		CPAMOZ*		AMOZ		FTD	
IC <sub>50</sub>	LOD	IC <sub>50</sub>	LOD	IC <sub>50</sub>	LOD	IC <sub>50</sub>	LOD
(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)
0.17±0.03	0.02±0.01	0.28±0.01	0.03±0.01	1.15±0.04	0.11±0.03	1.63±0.06	0.36±0.10

[0135] \*为 CPAMOZ II

[0136] 由图 2 和表 1 可知,单克隆抗体对 NPAMOZ,CPAMOZ,AMOZ 和 FTD 都有特异性的识别,IC<sub>50</sub> 在 0.17-1.63ng/ml 之间;若以 NPAMOZ 作为目标物,LOD 值为 0.02ng/mL,远低于欧盟限定标准,因此,基于单抗的 ELISA 具有高度特异性和足够的灵敏度来检测样品中的 AMOZ(以 NPAMOZ 的形式);另外由图 2 和表 1 还可以看到,虽然所制备的单克隆抗体对 NPAMOZ 识别能力更强(IC<sub>50</sub> 为 0.17ng/mL,LOD 值为 0.02ng/mL),但其对 AMOZ 的识别能力(IC<sub>50</sub> 为 1.15ng/mL,LOD 为 0.11ng/mL)也能达到欧盟限定标准,在没有衍生化试剂加入的情况下,NPAMOZ 和 CPAMOZ 均不存在,而 FTA 在动物体内极不稳定,因此,所建立的 ELISA 可以无需衍生化步骤而直接检测样品中的 AMOZ。

[0137] (6)ELISA 的特异性

[0138] ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示。交叉反应率(CR%) = NPAMOZ 的 IC<sub>50</sub>/测试物质的 IC<sub>50</sub> × 100%。交叉反应率越小,ELISA 的特异性越高。

[0139] 在本发明选择 9 种 NPAMOZ 的结构类似物和其它 8 种药物进行交叉反应实验,结果如表 2 所示。

[0140] 表 2. 单克隆抗体与硝基咪唑类药物及其它八种药物的交叉反应率

[0141]

		IC <sub>50</sub>	交叉反应率
		(ng/ml)	(%)
硝基咪唑类	NPAMAZ	0.17	100
	CPAMAZ*	0.28	61
	AMAZ	1.15	14.8
	FTD	1.63	10.42
	NPAZ	>10000	<0.01
	NPAHD	>10000	<0.01
	NPSEM	>10000	<0.01
	NFZ	>10000	<0.01
	NFT	>10000	<0.01
	FZD	>10000	<0.01
抗生素	氯霉素	>10000	<0.01
	林可霉素、	>10000	<0.01
	莫能霉素	>10000	<0.01
	土霉素	>10000	<0.01
	甲泼尼龙	>10000	<0.01
	甲硝唑	>10000	<0.01
	盐酸克伦特罗	>10000	<0.01
	18-甲基炔诺酮	>10000	<0.01

[0142] \* 为 CPAMAZ II ;

[0143] 从表 2 中看出,单克隆抗体与 NPAMAZ, CPAMAZ, AMAZ 和 FTD 的交叉反应率分别为 100%,61%,14.8%和 10.42%,与其他硝基咪唑物质和药物都没有交叉反应。在没有衍生化试剂加入的情况下,NPAMAZ 和 CPAMAZ 均不存在,而 FTA 在动物体内极不稳定,因此,所建立的 ELISA 可以无需衍生化步骤而直接检测样品中的 AMAZ。

[0144] 5. ELISA 对加标样品中 AMAZ 含量的测定

[0145] 选择了四种样品:鱼肉、虾肉、鸡肉和猪肝进行加标反应实验。同一样品取两份,一份加入适量的 AMAZ 溶液,一份作为空白样品。在样品中分别加入 4.0mL H<sub>2</sub>O 和 0.5mL 1.0mol/L 盐酸溶液,旋涡,37℃振荡孵育 16h 后,分别加入 5.0mL 0.1mol/LK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.4mL 1.0mol/L NaOH 和 5.0mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 30s,室温下 5000r/10min 离心,再用乙酸乙酯提取 2 次,合并乙酸乙酯层,氮气吹至干,用 1.0mL 正己烷溶解干燥物,加入 1.0mL 磷酸缓冲液 (pH = 7.2),室温下 3000r/10min 离心,上清用水稀释后用 ELISA 直接测定,结果如表 3 所示,加标回收率为 72.6-102.7%,相对标准偏差为 6.1-17.7% (n = 4)。

[0146] 表 3. ELISA 直接检测加标样品中 AMAZ 的回收率和相对标准偏差

[0147]

样品	加标浓度 (ng/g)	测定浓度 (ng/g)	回收率 (%)	相对标准偏 差(%)
鱼肉	0	ND <sup>a</sup>		
	0.5	0.473±0.041	94.6	8.7
	1.0	1.027±0.065	102.7	6.3
	5.0	4.831±0.565	96.6	11.7
虾肉	0	ND <sup>a</sup>		
	0.5	0.482±0.053	96.4	11.0
	1.0	0.820±0.065	82.0	7.9
	5.0	4.935±0.756	98.7	15.3
鸡肉	0	ND <sup>a</sup>		
	0.5	0.363±0.061	72.6	16.8
	1.0	0.867±0.169	86.7	19.5
	5.0	4.368±0.267	87.6	6.1
猪肝	0	ND <sup>a</sup>		
	0.5	0.441±0.046	88.2	10.4
	1.0	0.757±0.055	75.7	7.3
	5.0	4.023±0.712	80.5	17.7

[0148] <sup>a</sup> 不能检出

[0149] 6. ELISA 与 HPLC 的比较

[0150] HPLC 测定条件为：色谱条件：C18 柱 (4.6mm×250mm, 5 μ m), 流动相为乙腈：异丙醇：乙酸：0.05% 庚烷磺酸钠 (10：10：0.1：80, v/v)；流速为 1mL/min；进样量为 20 μ L；紫外检测波长为 280nm；NPAMAZ 标准溶液浓度为：20, 50, 100, 150, 200, 250, 300ng/mL, 样品萃取液用 0.25 μ m 的滤膜过滤后直接测定；

[0151] 四种样品加入不量的 AMOZ (鱼肉：加标量分别为 150ng/g 和 300ng/g；虾肉：加标量分别为 100ng/g 和 250ng/g；鸡肉：加标量分别为 50ng/g 和 200ng/g；猪肝：加标量为 20ng/g), 加标样品经衍生化步骤处理后用 HPLC 检测, 加标样品不经过衍生化步骤, 只是加酸水解, 乙酸乙酯萃取, 样品中的 AMOZ 由以 AMOZ 为对象的 ELISA 标准曲线定量检测, 以 HPLC 的测定结果为横坐标, ELISA 测定结果为纵坐标作图, 得两者的相关曲线, 如图 3 所示, 回归曲线为  $Y = 0.9742X - 7.6001$  ( $r = 0.9889$ ,  $n = 7$ ), 表明 ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

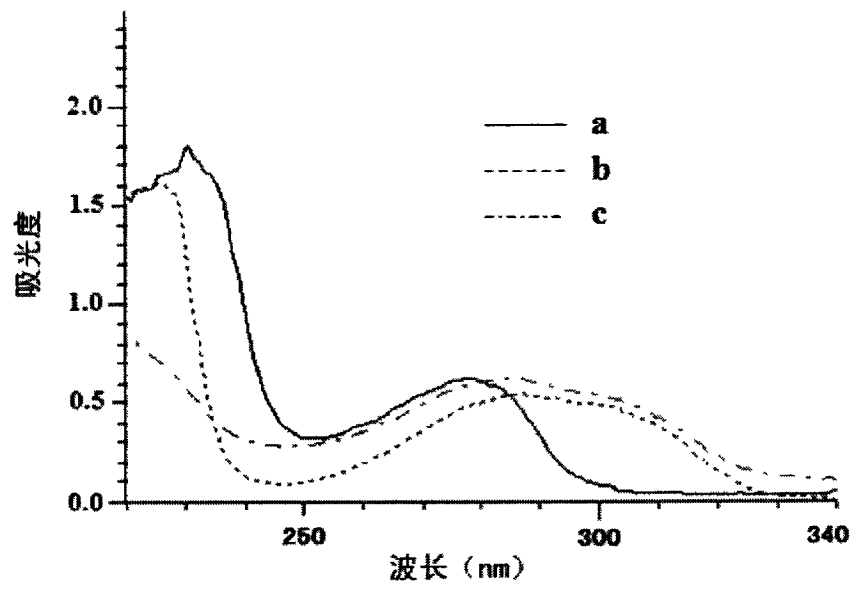


图 1

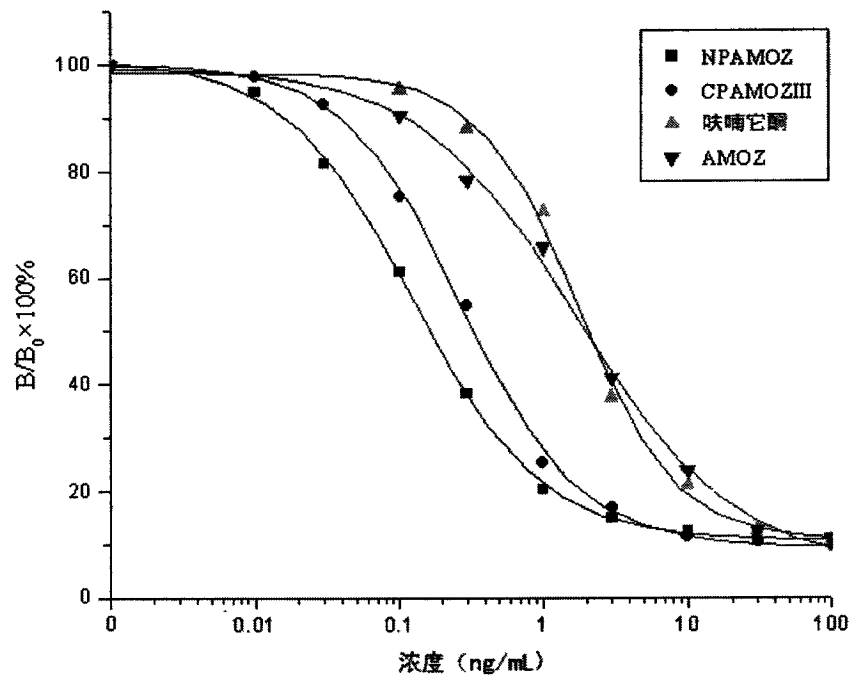


图 2

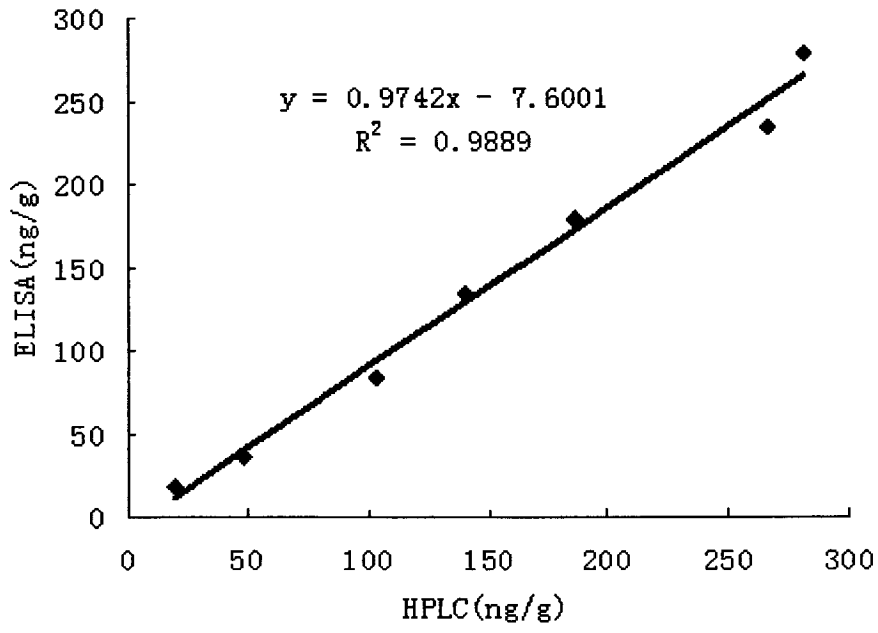


图 3

专利名称(译)	一种检测食品中呋喃它酮代谢物含量的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102621326B</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201210042064.9	申请日	2012-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	邓安平 宋娟 杨红		
发明人	邓安平 宋娟 杨红		
IPC分类号	G01N33/64 G01N33/531		
代理人(译)	李涛		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN102621326A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了直接检测食品中呋喃它酮代谢物AMOZ含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。其特点是合成了三种不同的AMOZ半抗原衍生物，并将衍生物与载体蛋白质交联，合成三种免疫原和包被抗原，运用杂交瘤单抗制备技术制得单克隆抗体。所建立的ELISA可以无需衍生化步骤而直接检测样品中的AMOZ；所制备的单抗与其它硝基呋喃类物质及其代谢物和8种抗生素均没有交叉反应，说明抗体的特异性很高。四种肉样即鱼肉、虾肉、鸡肉和猪肝中加入不同量的AMOZ，并用ELISA直接测定，加标回收率为72.6-102.7%，相对标准偏差为6.1-17.7%；七份加标样品同时用HPLC和ELISA检测并比较测定结果，回归曲线为 $Y = 0.9742X - 7.6001$ ，线性相关系数为0.9889，表明两种方法有较好的相关性。

